

REMARKS

Claim 11 has been cancelled. New claims 12-20 have been added. As such, claims 1-10 and 12-20 are pending. The amendments to claim 1 and support for the new claims may be found in the specification on pages 10 and 11. No new matter has been added with the amendments and new claims. As such, entry thereof is respectfully requested.

Rejections under 35 U.S.C. §§101 and 112, second paragraph

Claim 11 has been rejected under 35 U.S.C. §§101 and 112, second paragraph, as being an improper use claim. Claim 11 has been cancelled, thus obviating these rejections.

Rejections under 35 U.S.C. §102

Claims 1, 2, 4 and 8-11 have been rejected under 35 U.S.C. §102 as being anticipated by Tani et al. or Arinaga et al. Tani et al. is asserted to teach the intravenous administration of lentinan to enhance the activity of LAK cells. Arinaga et al. is similarly asserted to teach the injected administration of lentinan to enhance the activity of LAK cells. Applicants traverse these rejections and withdrawal thereof is respectfully requested.

The present invention, as encompassed by amended claim 1, is drawn to a LAK activity enhancer containing an extract of *Lentinus edodes* mycelium, which is prepared by

preparing a suspension by crushing and delignifying a solid medium containing *Lentinus edodes* mycelia in the presence of water and one or more additive enzymes selected from the group consisting of cellulase, protease and glucosidase, wherein the solid medium is based on bagasse and defatted rice bran; and

raising the temperature of the suspension to about 80-100°C to inactivate the enzymes.

The present invention of claim 12 is drawn to a method of enhancing LAK activity with an extract of *Lentinus edodes* mycelium, which has been prepared in accordance with the method described above. Claim 20 is drawn to the method of preparing the extract.

As noted by the Examiner, both Tani et al. and Arinaga et al. teach the administration of lentinan. However, it was known in the art as the time of the present invention that lentinan is derived from the fruiting body of *Lentinus edodes*, not the mycelium as required by the present invention. More specifically, lentinan is prepared by purifying a polysaccharide that has been extracted from the fruiting body of *Lentinus*

edodes in boiling water. For example, attached hereto is a Japanese journal article, Junji Hamuro, "Biophylaxis and Cancer, Lentinan and A New Clinical Perspective," Kodansha Scientific (1994), which states in the relevant portion on page 78, lines 13-14, "the lentinan is prepared by extracting from the raw fruiting body (that is, the cap and the stalk portions) of *Lentinus edodes* in boiling water, followed by purification flow as shown in figure 2.2."

With the present invention, on the other hand, the LAK activity enhancer of claim 1 and LAK activity enhancer used in the method of claim 12 requires the feature that the extract is made from *Lentinus edodes* mycelium, not from the fruiting body. In addition, the extract from the *Lentinus edodes* mycelium of the present invention is prepared by crushing and delignifying a solid medium based on bagasse and defatted rice bran and containing *Lentinus edodes* mycelia in the presence of water and one or more additive enzymes; and raising the temperature of the suspension to about 80-100°C to inactivate the enzymes.

The resulting extract obtained using the recited method and the raw material of the present claims is different from that of lentinan. The present specification details in Example 1 (pages 21-22) that the extract of the present invention contains, for

example, approximately one quarter carbohydrates, about 20% proteins, poylphenols, crude fat, about 20% crude ash and about 20% soluble nitrogen-free materials other than carbohydrates. Thus, the extract of the present invention is distinct from lentinan, which is a single polysaccharide compound.

In addition, the present inventors have analyzed, using molecular weight separation chromatography, the extract obtained by the recited method of the present claims and compared the components of the present extract to the chromatograph of lentinan. Lentinan has a molecular weight of about 500 kDa. However, the extract of the present invention prepared from *Lentinus edodes* mycelium does not have any chromatography peak at 500 kDa, evidencing that the active component(s) of the present invention is not lentinan. As such, the extract of the present invention is distinct from the lentinan disclosed in Tani et al. and Arinaga et al. The present invention is, therefore, not anticipated by the references and withdrawal of the rejections is respectfully requested.

Claims 1, 2 and 4-11 have been rejected under 35 U.S.C. §102 as being anticipated by U.S. Pat. No. 4,461,760. U.S. '760 is asserted to teach oral or intrapertoneal administration of an

extract from *Lentinus edodes* to treat cancer. The Examiner asserts that the formulation would inherently be enhancing LAK activity even if the inventors of U.S. '760 failed to appreciate it. Applicants traverse this rejection and withdrawal thereof is respectfully requested.

The extract of the present invention prepared from *Lentinus edodes* mycelium in accordance with the recited method contains approximately 40% glucose as a primary component. The preparation of U.S. '760, on the other hand, contains primarily xylose as a primary component (LAP-1: 39.0% xylose and LAP-2:30.4% xylose).

Thus, the extract of the present invention of claim 1, due to the recited method of production, is distinct from that of U.S. '760 and the present invention is not anticipated by the reference. Withdrawal of the rejection is respectfully requested.

Rejections under 35 U.S.C. §103

Claims 1-5, 7 and 8 have been rejected under 35 U.S.C. §103 as being obvious over U.S. '760. The Examiner asserts that U.S. '760 differs from the present invention in the forms of extract administered and the amounts, but that the forms are well-known

and the determination of the dosage is routine optimization. Applicants traverse this rejection and withdrawal thereof is respectfully requested.

As discussed above, the extract of the present invention is different from the extract of U.S. '760 due to the recited method of preparation. There is no suggestion in the U.S. '760 reference of the presently recited extract or required recited the method for obtaining extract, which results in the distinct product. As such, the present invention is not obvious over U.S. '760 and withdrawal of the rejection is respectfully requested.

As the above amendments and remarks address and overcome the rejections, withdrawal thereof and allowance of the claims are respectfully requested.

Should the Examiner have any questions regarding the present application, she is requested to please contact MaryAnne Armstrong, PhD (Reg. No. 40,069) in the Washington DC area at (703) 205-8000.

A marked-up version of the amended claims showing all changes is attached hereto.

Applicants request a three (3) month extension of time for filing the present response. The required extension fee is attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. §§1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By *M. A. Armstrong*
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

MaryAnne Armstrong, PhD, #40,069

GMM/MAA/
0230-0161P

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachments



Appl. No. 09/830,449

MARKED-UP VERSION SHOWING CHANGES

IN THE CLAIMS

Claim 11 has been cancelled.

Claim 1 has been amended as follows.

RECEIVED

OCT 03 2002

TECH CENTER 1800.2900

1. (Amended) An A LAK activity enhancer containing an extract of *Lentinus edodes* mycelium, which is prepared by

preparing a suspension by crushing and delignifying a solid medium containing *Lentinus edodes* mycelia in the presence of water and one or more additive enzymes selected from the group consisting of cellulase, protease and glucosidase, wherein the solid medium is based on bagasse and defatted rice bran; and

raising the temperature of the suspension to about 80-100°C to inactivate the enzymes.

New claims 12-20 have been added.

工体防衛とがん

～レンチナンと新しい臨床展望～

羽室博樹/著

講談社サイエンスライブラリ

1998年11月20日

第1刷発行

2

がん免疫療法とレンチナン

2.1 レンチナンの歴史と構造・物性

レンチナンが食用キノコの代表であるシイタケの熱水抽出物を出発点に単一にまで精製された中性多糖であることはよく知られている。では、どうしてシイタケであったのか、あるいは、宿主伸介性の制がん作用がなぜ着目されたのであろうか。

2.1.1 宿主伸介性制がん作用の着想

日本のがん研究に偉大な足跡を残された（ニトロキノリンオキシドによる化学発がんの研究はよく知られる）、国立がんセンター研究所初代所長の中原一郎博士は、従来の選択細胞毒性を主軸に据えた化学療法剤に対して“宿主を介在してがんがんに働きかけるような制がん剤の開発”を提唱された。薬剤の副作用で患者を苦しめてはいけないということ、率は低くてもがんの中には自然治癒を示す場合も確実に存在すること、免疫能を含む生体防御能力の低下した人のがんの発生頻度が相対的に高いことなどからして、人の体には、がんと戦う生体防御能が備わっていると考えられることの2点を主たる論拠としての提唱である。現在では、作用機序の異なる多様な化学療法剤も開発されつつあるが、当時のものは、基本的にがん細胞に対する選択性をよりどころにする細胞毒であり、分裂の盛んな生体細胞や骨髄細胞に対してより強い細胞毒作用を示すという必然のジレンマを突破することはできなかった。

2.1 レンチナンの歴史と構造・物性

2.1.1 がん化学療法剤の分類

- ・代謝阻害剤、ヌクレオチド合成阻害剤 (Ara-C, NTX) (SFD)
- ・DNA 損傷剤、架橋 (CDDP, メタロチオネイン)
- ・フルキル化剤・核酸アルキル化 (CY, クロラムブシル, MNIC)
- ・Topo II 阻害剤 (ADM, MNC, CDP)
- ・ROS 生成 (ADM, MNC, CDDP)
- ・PAC 阻害剤、シグナル伝達阻害
- ・有糸分裂阻害 (VCR, VLB)

(何れも延命効果は弱い)

これに対し、“宿主伸介性制がん剤”は直接にがん細胞を攻撃するものではなく、がん細胞を攻撃する生体の防御機構を強化して間接的にがんを退縮に向かわせたり、“がん細胞と共存共栄を図ろうとする概念に基づいたものである。現在、レンチナンは BRM (biological response modifiers) と分類されているものの、時にがん免疫療法剤、時に生体防御能増進剤と称されるゆえんである。現在では、臨床現場においても、がん患者の QOL とがん末期治療 (ターミナル・ケア)、ホスピスといった概念が強調されているが、中原博士の提唱にはこうした概念もすでに内包されていたもので、1960 年代半ばですこぶる先駆的な提言ととらえられる。表 2.1 には化学療法剤の分類を大まかに紹介する。

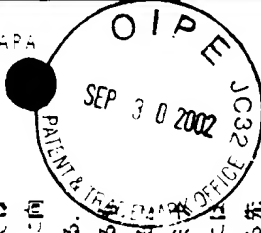
2.1.2 宿主伸介性制がん作用の評価

生体防御能力を分して間接的に制がん効果を示す物質を評価するには、培養がん細胞などを用いる *in vitro* の増殖抑制試験は全く用いることができない (図 2.1) そこで中原博士、そして終生の研究伴侶であった同研究所化学療法部部長の福岡文子博士は S180 (サルコーマ 180) 肉腫をマウスの鼠蹊部皮下に移植する系による評価を工夫された。例えば、本肉腫を ICR マウスに 3 × 10⁶ 皮下移植しその翌日から 10 日間試料を腹腔内投与 (ip) する系では、レンチナン投与群は最初の約 2 週間、対照群 (生理食塩水投与群) と腫瘍の増殖にはほとんど差異は認められず、2～3 週間目より増殖抑制効果が認められ、5 週目の判定時には腫瘍の退縮率を 90～100% の水準で示す。この系が当時用いられた唯一の評価系であった。効果の数量化は S180 移植後 5 週目に移植部位を切開して精査し、完全退縮数 = 腫瘍の全く認められないマウス個体数 ÷

RECEIVED

DEC 03 2002

TECH CENTER 0002



2 がん免疫療法とレンチナン

レンチナン $\text{mg/kg} \times 10$ (投与量)

対照群

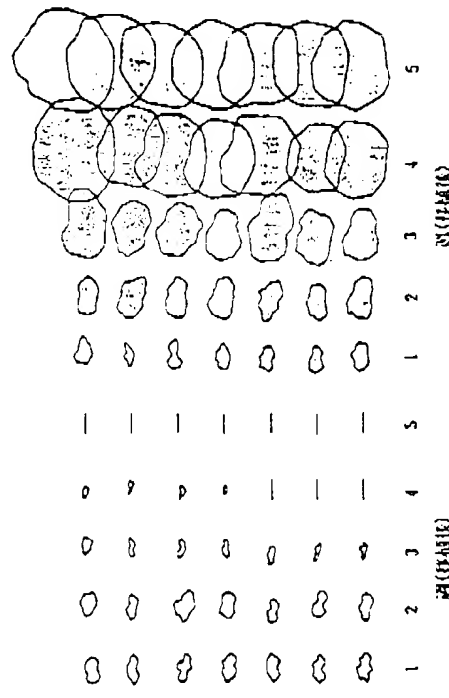


図 2 レンチナンのザルコーマ S180 移植腫瘍に対する効果
(減量によるテラセゲン)

処置されたマウスの全個体数 (CR: Complete Regression) および腫瘍退縮率 (%) = 処置群の腫瘍重量平均 ÷ 対照群の腫瘍重量平均 $\times 100$ (R: Inhibition Ratio) の 2 つの指標で効果を示すこととされた。本系は S180, ICR と腫瘍一宿主のいずれにおいてもその遺伝的背景が明確でなく、次の 2 点で特に“人のがん”への効果と対応しないという指摘のあったことも事実である。

その一つは、腫瘍—宿主の遺伝的背景が異なり、移植拒絶のモデルにはなりえても自家がんの系には程遠いものであるとするとする点である。もう一つは、S180 の有する抗原性もしくは免疫原性が強く、その点でも自家がんの系である“人のがん”とは免疫学的挙動が異なるものである。いずれの指標も合理的である。逆に、本 S180 が遺伝的背景の異なる (H-2...主要組織適合性抗原) 種々のマウスに定着し、増殖する点は、実験科学的アブローナ—ナに肝都合であったことは否めない。

化学療法剤とは異なり、レンチナンは本系において、移植翌日から投与にもかかわらず、投与開始後、2~3 週間経過してはじめてその効果を示し始める点は重要である。以上がレンチナン発見の端緒となった評価系である。宿主

2.1 レンチナンの歴史と構造・特性

仲介性作用に視点を置くため、1 つの試料の効果判定にも 1.5~2 か月の長期間を要する点、細胞毒性を中心作用とする化学療法剤の開発と苦勞のレベルが異なり、必然的に多くの材料を探索することは不可能であった。すなわち、評価する材料対象を絞り込む必要があった。

2.1.3 レンチナンとシイタケの結びつき

評価対象の数に限定があるとすれば、何をよりどころに対象を確保するか。ここにも当時の国立がんセンター研・化学療法部の創設があったわけである。1960 年代後半合成品で 2.1.1 で述べた宿主仲介性作用を示唆する物質は皆無であった。したがって、対象は必然的に天然物に絞られ、多数の候補が挙げられた。当時の化学療法部の千原英郎室長は中国を中心とする東南アジアでの民間伝承薬に注目された。なかんずく、“瘡癰論”に記載される伝承薬に注目され“キノコ”に焦点を合わせることとなった。キノコはその香りにとどまらず多くの生理活性物質を含むことはよく知られている。前述の評価系で多くのキノコの熱水抽出物が評価され、マツタケを含む種々のものに活性のあることが判明した。シイタケ材料としての費用の点を考えてのことである。他のキノコの熱水抽出物にも活性は認められ、その強度もシイタケ熱水抽出物をしのぐものもあった。ただし、これらの活性本体がレンチナン同様多糖類であるのか否かは定かではない。なお、代表的なキノコのうちでもキクラゲやハラタケ (シヤンビニオン) の熱水抽出物には本評価系では活性は認められなかった。この材料の絞り込みの経緯については、千原博士の戒書に詳しいので参照されたい²⁾。表 2.2 には食用菌類を中心とする担子菌類の熱水抽出物の S180 に対する抗腫瘍性のうち、代表的なものを示す (本決定は熱水抽出物について行われたもので、活性成分の含量に高低があり、表の活性をもって効果の強弱を単純に議論することはできない)。また、レンチナンにつき、臨床サイドからよくなされる質問が、(経口投与では効かないのか) という点である。確かに民間伝承薬に瘡癰の原薬があり、一見矛盾する点であるが、前述の評価系では“レンチナンは経口投与では無効である”。ただし、熱水抽出物そのものが経口投与で無効か否かは検討していない。粗抽出物に含有される他の成分がキヤリアーとして機能して、腸管からの経口吸収を促進する可能性もあり、瘡癰の原

2 がん免疫療法とレンチナン

表 2.2 因子固縮、食用型熱水抽出エキスのサルコマー180に対する抗腫瘍性

(組 名)	腫瘍の完全消滅	腫瘍抑制率 (%)
コフキサルノコシカケ	5/10	64.9
カリラタケ	4/8	77.5
アラサカラタケ	2/10	65.0
オキナリメンタケ	1/10	49.2
カイガラタケ	0/8	23.9
チカイイガラタケ	1/7	70.2
ベッコウタケ	3/10	44.2
オシロイタケ	0/7	44.8
ウスバシロイタケ	1/10	45.5
メシマコブ	7/8	96.7
シイタケ	6/10	60.7
エノキタケ	3/10	81.1
ヒラタケ	5/10	75.3
カンタケ	0/8	72.3
ササコ	2/10	66.5
マツタケ	5/9	91.8
キクラゲ	0/9	42.6

(100 mg/kg × 10, 腹腔内投与)

点と必ずしも矛盾しない。後述のように、「レンチナンは完全に単一に精製された中性多糖」であり、陰タンパク工程によりタンパク、糖タンパク成分も除去されており、この辺の事情が経口での有効性に影響しているものと考えられる。

レンチナンはこのような経緯で着想、展開されて見いだされた物質である。この意味で「東洋医学の根本思想と軸を一新する」と言える。東洋医学の根本思想は病源を直接攻撃するよりも、患者一生体の病的状態の修復に基本をおくからである。「がん細胞の増殖ではなく、がん患者の治療」を視野に入れた場合、がん組織（がん実質細胞と間質の反方を総称）と宿主の相互関係が重要であり、宿主のがん細胞に対する応答と宿主の神経・内分泌・免疫系を含めての生理的均衡（ホメオスタシス）をも包含する総合的治療体系が求められる。

2.1.4 シイタケからレンチナンの登場へ

レンチナンは生シイタケの子実体（カサと柄の部分）を熱水抽出した後、図2.2に示す精製フローによって得られたものである³⁾。合計6種の多糖体が得

2.1 レンチナンの歴史と精製・特性

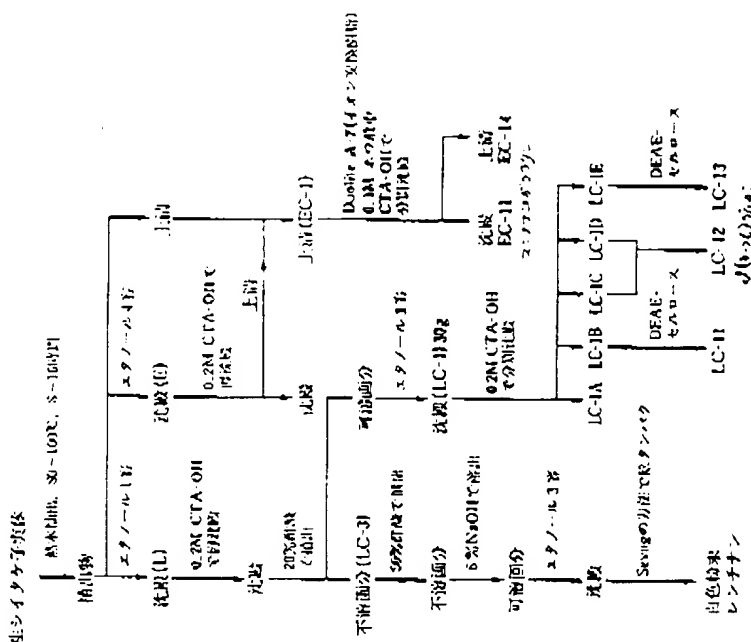


図 2.2 生シイタケ熱水抽出エキスをからレンチナン分離精製

られ、そのうちの1画分LC33をSavag法と呼ばれるタンパク溶性不溶化法を用いて除タンパクしたもののが、単一多糖類としてのレンチナンである⁴⁾。本精製法の特徴は、エタノールによる分別沈殿とセチルトリメチルアンモニウムクロキシドという強塩基物質による沈殿化と形成された複糖からのも多糖類の弱酸（酢酸）による分別可溶化にある。これらは、高分子量の多糖類が、水に溶解性であること、糖の水酸基（OH）が弱酸性を示すことに焦点をあてたものである。レンチナンが多糖類として単一であることは、グラスファイバーを担体とする高圧電気泳動（電荷をもたすために流動液にホウ酸緩衝液を用いると

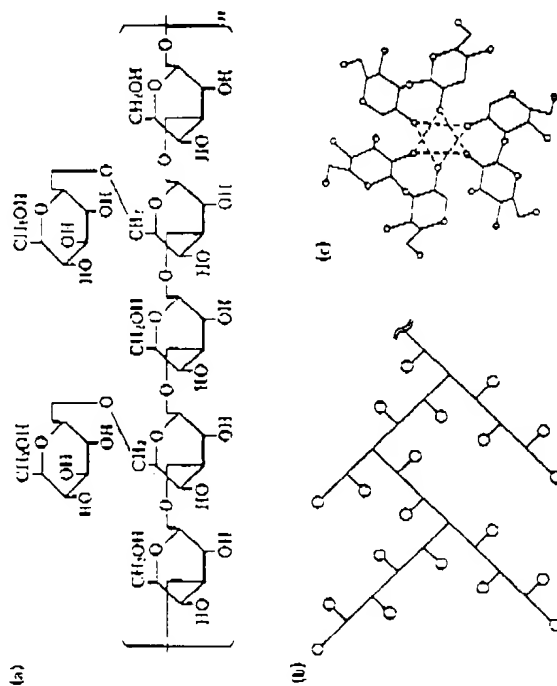


図 2.3 レンチナンの化学構造

(a) 単位一次構造, (b) 一次構造, (c) 三重らせん構造

ころが肝要) や遠心により確認された。"レンチナンは水には難溶でアルカリには可溶である"。旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +19.5^\circ \sim +21.5^\circ$ (10% NaOH 水溶液に 1% 濃度に溶解させた時) を示し、"分子量は約 50 万" である。その化学構造は図 2.3 に示すように β -1,3-グルコピラノシド結合を主鎖とし、グルコース残基 5 個からなる直鎖単位に 2 個の β -1,6-グルコピラノシド分岐を有する基本構造が繰り返されているものである。

天然物由来の物質の生理活性の本体が真に多糖であるか否かを最終的に確認するのはすこぶる困難であるが、レンチナンが多糖類としては単一であることに加え、以下の理由で活性本体は、上記構造を有する β (1 \rightarrow 3) グルカンであることが確定された。まず第一に、レンチナンを過ヨウ素酸で酸化すると活性がなくなること、本酸化工程のあとに部分加水分解して、直鎖状の分岐を有しない β (1 \rightarrow 3) グルカン (LORII と称した) にすると活性が回復することである。

2.1 レンチナンの歴史と構造・特性

さらに同様の構造を有するが、活性をもたないパヒマン (茯苓より得られる) を同様な化学処理をして直鎖状の β (1 \rightarrow 3) グルカンであるパヒマランにする。レンチナン同様の活性が認められることより、同じく不活性型のパヒマン⁶⁾ をヒドロキシエチル化すると活性型になること、パヒマンを 6M 尿素と処理すると活性型になることなものである⁷⁾。多糖選択的な反応により活性が消滅したり、逆に活性が出現することは、活性本体が多糖体であることを示すと考えたわけである。

レンチナンの本構造は核磁気共鳴によっても確認され⁸⁾、また X 線解析の結果では図 2.3 に示すような三重らせん構造 (triple helix) を有するとされている⁹⁾。レンチナン本体は分子量 50 万であるが、辛酸で分解した分子量は 6,000 \sim 10,000 の低分子化 β (1 \rightarrow 3) グルカンにも活性は保持されるが (ただし、有効残基量は分子量に逆比例して増加する)、6,000 以下にまで分解すると活性は消滅する¹⁰⁾。

表 2.3 ランチンソルブミンの高水精製実験

多 糖	-b	SISB に対する抗腫瘍効果		解 池
		阻害率 (%)	比重量 (mg/kg) $\times 10$	
レンチナン	278	100	1	β (1 \rightarrow 3) グルカン
ハイドロキシエチルパヒマン	278	100	5	β (1 \rightarrow 3) グルカン
ハイドロキシプロピルパヒマン	270	99.3	5	β (1 \rightarrow 3) グルカン
LCII (シイタケ熱水抽出物成分)	270	93.6	5	β (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6) グルカン
スクレログルカン	240	90.4	2.5	β (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) グルカン
GE3 (茯苓多糖)	255	91.3	100	β (1 \rightarrow 6) グルカン
カルボキシメチルパヒマラン	238	100	25	β (1 \rightarrow 3) グルカン
対照	236	—	—	—
スターチ	236	—	無効	α (1 \rightarrow 4) グルカン
ラミナリン	248	1.5	25	β (1 \rightarrow 3) グルカン
カルボキシメチルセルロース	244	4.5	10	β (1 \rightarrow 4) グルカン
パヒマン硫酸エステル	244	12.3	25	β (1 \rightarrow 3) グルカン
ハイドロキシエチルスターチ	240	—10.0	10	α (1 \rightarrow 4) グルカン
ヘパリン	234	—	無効	ムコ多糖
パヒマラン硫酸エステル	224	34.8	25	β (1 \rightarrow 3) グルカン
デキストラン	216	—	無効	α (1 \rightarrow 6) グルカン
イヌリン	192	—	無効	フルクタン

透光分枝の測定: $5 \times 10^{-3} M$ の多糖と 0.5% のウシ血清アルブミンを 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 5.3) で混合。
(レンチナンのみ濃度は $4 \times 10^{-3} M$)